

(19)

**Europäisches Patentamt****European Patent Office****Office européen des brevets**

(11)

**EP 0 955 308 A1**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**(43) Veröffentlichungstag:  
10.11.1999 Patentblatt 1999/45(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C07K 1/12, C07K 1/36,**  
**C07K 7/23**(21) Anmeldenummer: **99105639.1**(22) Anmeldetag: **19.03.1999**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV MK RO SI**

(30) Priorität: **27.03.1998 DE 19813849**

(71) Anmelder:  
**Degussa-Hüls Aktiengesellschaft  
60287 Frankfurt am Main (DE)**

(72) Erfinder:  

- **Günther, Kurt, Dr.**  
**63526 Erlensee (DE)**
- **Kunz, Franz-Rudolf, Dr.**  
**63526 Erlensee (DE)**
- **Drauz, Karlheinz, Prof. Dr.**  
**63579 Freigericht (DE)**
- **Müller, Thomas, Dr.**  
**63486 Bruchköbel (DE)**

**(54) Verfahren zur einstufigen Umsalzung und Aufreinigung von Oligopeptiden**

(57) Die vorliegende Erfindung richtet sich auf ein Verfahren zur einstufigen Umsalzung und Aufreinigung von Oligopeptiden. Oligopeptide fallen bei ihrer Synthese häufig nicht direkt als Acetate an. Acetatsalze von Oligopeptiden sind aber aus medizinischen und formulierungstechnischen Gründen als Bulkactives wünschenswert. Aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren arbeiten bisher mit zwei getrennten Schritten oder mit pyridinhaltigen Laufmitteln.

Erfindungsgemäß kann die Umsalzung und Aufreinigung in einem Schritt vereinigt oder der Einsatz von Pyridin als Laufmittel vermieden werden, wenn das Oligopeptid in Form seines Chloridsalzes mit einem acetathaltigen Laufmittel nach flüssigchromatographischen Methoden gereinigt wird.

**EP 0 955 308 A1**

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein einstufiges Verfahren zur Umsalzung und Aufreinigung von Oligopeptiden.

5 [0002] Oligopeptide entfalten häufig bioaktive Wirkung und erfahren deshalb Anwendungen als Therapeutika. Als Beispiel seien Agonisten und Antagonisten des LHRH genannt, welche unter anderem zur Bekämpfung von bestimmten Krebserkrankungen zum Einsatz kommen.

[0003] Die Herstellung der zu reinigenden Oligopeptide kann nach Verfahren des Standes der Technik erfolgen. Sinnvoll sind u.a. die Merrifield-Peptidsynthese an festen Trägermaterialien oder die klassische Synthese in Lösung. Sowohl

10 bei der Merrifield-Festphasensynthese wie auch bei der Synthese in Lösung ist es essentiell, bestimmte Bereiche im Molekül mit Schutzgruppen zu versehen, die am Ende der Herstellung wieder abgespalten werden. Bei der Festphasensynthese ist es darüberhinaus notwendig, das Oligopeptid von dem festen Träger zu entfernen. Für weitere Ausführungen zur Synthese von Peptiden sei auf die einschlägig bekannte Literatur verwiesen (Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band 15/1 und 15/2; M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag 1984).

15 [0004] Handelt es sich bei dem herzustellenden Peptid um ein Pharmakum, so ist es häufig gewünscht, das Oligopeptid in der Form seines Acetatsalzes vorliegen zu haben, um dem Patienten keine körperfremden oder weitere kritische Stoffe im Gleichschritt mit der Gabe des Medikaments applizieren zu müssen.

[0005] Häufig ist es so, daß das Oligopeptid durch Syntheserestände bedingt nicht als Acetatsalz anfällt, sei es, weil andere Säuren als Essigsäure zur finalen Abspaltung der Schutzgruppen herangezogen werden müssen, sei es, weil

20 die freie Form des Peptids nicht oder nur umständlich herzustellen ist und eine einfache Umwandlung in das Acetat mittels Essigsäure nicht gelingt. Zur Abspaltung der Schutzgruppen oder zur Abspaltung des Peptids von dem zur Synthese benötigten Harz ist man meist auf stärkere Säuren wie Trifluoressigsäure, Salzsäure oder Bromwasserstoff angewiesen. Für weitere Details diese Abspaltungen betreffend sei wiederum auf die Lehrbücher verwiesen (Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band 15/1 und 15/2; M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag 1984).

25 [0006] Zur Herstellung eines für die Applikation am Tier oder Menschen benötigten Acetats des betreffenden Oligopeptids ist man in oben genannten Fällen gezwungen, das Oligopeptid umzusalzen.

[0007] Das als Wirksubstanz zu prüfende oder als Therapeutikum bereits im Handel befindliche Oligopeptid muß hinsichtlich seiner Reinheit besonderen Anforderungen genügen. Es wird meist in Ermangelung einer geeigneten klassischen Reinigungsmethode eine Aufreinigung des Produktgemisches der Synthese mittels Chromatographie - speziell Hochdruckflüssigkeitschromatographie - angewandt. Dazu ist es notwendig, das Oligopeptid vor dem Aufbringen auf die Säule bevorzugt im Lösungsmittelgemisch des als Eluent gewählten Laufmittels aufzunehmen.

30 [0008] Für Oligopeptide sind in der Literatur bisher mehrere Verfahren beschrieben worden, die deren Umsalzung und Aufreinigung zum Gegenstand haben. Laut Gabriel (Int. J. Peptide Protein Res. 1987, 30, 40-43) kann das Oligopeptid GRF(1-44)-NH<sub>2</sub> aus seinem Trifluoracetat mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie unter Verwendung von pyridin- und essigsäurehaltigen Laufmitteln in das Acetat verwandelt werden. Bezüglich der Reste von Pyridin, welche unweigerlich nach einer solchen Prozedur im Oligopeptid zurückbleiben, bestehen allerdings hinsichtlich toxikologischer Eigenschaften dieses Stoffes Bedenken. Auch aus Arbeitsschutzgründen scheint ein Aufreinigungsverfahren, welches mit größeren Mengen an gefährlichem Pyridin arbeitet, nachteilig.

35 [0009] Unter Umgehung des pyridinhaltigen Laufmittelsystems versuchten Hoeger et al. (BioChromatography 1987, 2, 134-142) GnRH-Peptide umzusalzen und aufzureinigen. Ausgehend von den Fluoridsalzen erfolgt hier eine zweistufige Reversed-Phase-Chromatographie mit Gradientenfahrweise in Triethylammoniumphosphat(TEAP)- und Trifluoacetat(TFA)-Puffern mit Acetonitril als Modifier. Nach Lyophilisation der aufgereinigten Peptidfraktionen schließt sich die Konvertierung zu den Acetatsalzen via Anionenaustauschchromatographie mit verdünnter Essigsäure bzw. Reversed-

40 Phase-Chromatographie im Ammoniumacetat/Acetonitrilgradienten an.

[0010] Die EP 0145258 beschreibt u.a. die Aufreinigung von HF-Salzen von Nona- und Dekapeptiden der Gruppe der LHRH-Agonisten. Auch hier erfolgt die Umsalzung getrennt vom Aufreinigungsschritt erst über Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Endreinigung an einer octadecylsilanisierten Kieselgelphase mittels eines Eluenten bestehend aus Ammoniumacetat und Acetonitril unter Hochdruckbedingungen.

45 [0011] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Angabe eines weiteren Verfahrens zur Umsalzung und Aufreinigung von Oligopeptiden, welches diese beiden Arbeitsschritte in einem vereinigt und welches ohne die Verwendung von Pyridin auskommt.

[0012] Diese und nicht näher bezeichnete weitere Aufgaben, welche sich jedoch für den Fachmann in naheliegender Weise aus dem Stand der Technik ergeben, sind Gegenstand des kennzeichnenden Teils des Anspruch 1. Bevorzugte

50 Ausgestaltungen des erfundungsgemäßen Verfahrens sind Gegenstand der auf Anspruch 1 rückbezogenen Unteransprüche.

[0013] Dadurch, daß man das umzusalzende bzw. aufzureinigende Oligopeptid als sein Hydrochloridsalz per Flüssigchromatographie mittels eines acetathaltigen Laufmittels reinigt, gelangt man äußerst einfach und dennoch vorteil-

EP 0 955 308 A1

haft zu praktisch chloridfreien aufgereinigten Oligopeptidacetaten. Es gelingt demnach mit dem erfundungsgemäßen Verfahren die vormals nur in zwei Stufen oder durch Einsatz von toxikologisch bedenklichem Pyridin zu bewerkstelligende Aufreinigung und Umsalzung der betrachteten Oligopeptide in einem einzigen Arbeitschritt ohne Zusatz von Pyridin zu vereinen. Die durch das vorliegende Verfahren erhältlichen Produktfraktionen werden vorteilhafterweise vereinigt und durch Lyophilisation getrocknet. Man erhält das Acetat aus dem Chlorid in einer Ausbeute von ca. 85%. Das so erhaltene bis zu einem Prozentsatz von 99,5% reine Oligopeptidacetat kann als Wirkstoff nach Formulierung für eine medikamentöse Therapie herangezogen werden.

5 [0014] Für das vorliegende Verfahren ist es notwendig, daß die Oligopeptide in Form ihrer Chloride zum Einsatz kommen. Der einfachste Weg, um dies zu erreichen, ist der Einsatz von Salzsäure für die Schutzgruppenabspaltung. Auf 10 der anderen Seite sind aber die Peptidhydrolyse und andere Nebenreaktionen an Seitenkettenfunktionalitäten durch die Säurestärke des Abspaltungsagens bestimzte ungewollte Konkurrenzreaktionen. Aus diesen und anderen Gründen (wie z.B. Löslichkeit des Peptids in TFA) werden für derartige Entschätzungen häufig weniger starke wasserfreie Säuren wie z.B. Trifluoressigsäure oder wasserfreie starke Säuremischungen herangezogen wie z.B. HBr/Eisessig.

15 [0015] Völlig überraschend und dennoch äußerst vorteilhaft ist jetzt gefunden worden, daß man geschützte Oligopeptide auch mit konzentrierter wäßriger Salzsäure entschützen kann und daß die daraus entstehenden Salze der Oligopeptide gegenüber der gängigeren Abspaltung mit der wasserfreien weniger starken Trifluoressigsäure evtl. im Gemisch mit organischen Lösungsmitteln oder dem System HBr/Eisessig einen deutlich geringeren Anteil an Nebenprodukten aufweisen. Dies war weder naheliegend noch vorhersehbar.

20 [0016] Bei der eben beschriebenen Abspaltung der Schutzgruppen vom Oligopeptid arbeitet man bevorzugt in einem Temperaturbereich von -25 bis 30°C, besonders bevorzugt sind -10 bis 10°C und ganz besonders bevorzugt sind 0 bis 5°C.

25 [0017] Das Chloridsalz des Oligopeptids kann für die Aufreinigung mittels Flüssigchromatographie als seine konzentrierte salzaure wäßrige Lösung eingesetzt werden. Bevorzugt wird man aber das Chloridsalz nach der Entschätzung isolieren, z.B. durch Lyophilisation, und anschließend im Laufmittelsystem der Flüssigchromatographie oder in Essigsäure zuerst auflösen und auf die Säule geben.

[0018] Als Methode der Flüssigchromatographie wird bevorzugt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Aufreinigung der Oligopeptide angewandt. Als Lösungsmittelsysteme für die Gradientenelution benutzt man Laufmittel nachstehender Zusammensetzung:

30

35

Laufmittel A	Laufmittel B
i. 85 bis 98% Wasser	i. 20 bis 48% Wasser
ii. 2 bis 10% Essigsäure	ii. 2 bis 10% Essigsäure
iii. 0 bis 5% Acetonitril	iii. 50 bis 70% Acetonitril

oder

40

45

Laufmittel A	Laufmittel B
i. 85 bis 98% Wasser	i. 0 bis 10% Wasser
ii. 2 bis 10% Essigsäure	ii. 2 bis 10% Essigsäure
iii. 0 bis 5% Methanol	iii. 80 bis 98% Methanol,

50 bevorzugt für die Gradientenfahrtweise ist ein Lösungsmittelgemisch bestehend aus

55

Laufmittel A	Laufmittel B
i. 92% Wasser	i. 28% Wasser
ii. 5% Essigsäure	ii. 5% Essigsäure

EP 0 955 308 A1

(fortgesetzt)

Laufmittel A	Laufmittel B
iii.3% Acetonitril	iii.67% Acetonitril

5 oder

10	Laufmittel A	Laufmittel B
i. 90% Wasser	i. 5% Wasser	
ii. 5% Essigsäure	ii. 5% Essigsäure	
15 iii.5% Acetonitril	iii.90% Acetonitril	

[0019] Die Aufreinigung erfolgt bevorzugt bei einer Säulentemperatur von 5 bis 50°C, besonders bevorzugt sind 15 bis 35°C und ganz besonders bevorzugt sind 20 bis 30°C. Der Säulendruck sollte zwischen 5 und 100 bar, bevorzugt zwischen 20 und 80 bar und besonders bevorzugt zwischen 30 und 60 bar betragen. Als stationäre Phase können prinzipiell alle dem Fachmann geläufigen Materialien zur Reinigung genommen werden. Besonders gut eignet sich ein Reversed-Phase-Material. Als Reversed-Phase-Material werden Säulenpackungen verstanden die auf Trägermaterialien wie Kieselgel oder organischem Polymer basieren. Im Falle von Kieselgelen können die hydrophilen Oberflächen durch Organosilane modifiziert sein. Hierzu eignet sich neben anderen C-2, C-8 oder C-18 Modifikationen. Besonders bevorzugt ist der Einsatz einer C-18 modifizierten RP-18 Phase, ganz besonders bevorzugt ist die Nucleosil® 300-7-C<sub>18</sub> der Firma Macherey&Nagel oder Purospher® RP 18 (10µm) der Firma Merck.

[0020] Als Oligopeptide werden in der vorliegenden Anmeldung Peptide mit fünf bis fünfundzwanzig Aminosäuren verstanden. Bevorzugt ist der Bereich von Oligopeptiden mit acht bis zwölf Aminosäuren. Ganz besonders bevorzugt kommen Oligopeptide mit zehn Aminosäuren zur Anwendung.

[0021] Die oben beschriebene flüssigchromatographische Methode zur Umsalzung und Aufreinigung der Oligopeptide lässt sich sowohl nach der sogenannten Simulated-Moving-Bed-Technik als auch mittels cyclischer Chromatographie durchführen.

[0022] Ganz außerordentlich vorteilhaft kommt das erfundungsgemäße Verfahren in einer Synthese zur Herstellung der LHRH-Antagonisten Cetrorelix (1) und Antarelix (2)

35 **Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-**  
**D-Ala-NH<sub>2</sub> · 2CH<sub>3</sub>COOH**

40 1

**Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Lys(ε-isopropyl)-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub> · 2CH<sub>3</sub>COOH**

45 2

zum Einsatz. Die Einführung von tert.-Butylschutzgruppen in der Seitenkette von Serin und Tyrosin hat sich bei der Synthese besonders bewährt. Zur Gewinnung des Endproduktes müssen diese Schutzgruppen unter sauren Bedingungen (TFA bzw. HCl) wieder abgespalten werden. Bei der Abspaltung der tert.-Butylgruppen mit Salzsäure bilden sich deutlich weniger Nebenprodukte als bei der Verwendung von TFA.

[0023] Das optimierte Trennverfahren ist geeignet für die Prozeßchromatographie und erlaubt den Einsatz von präparativen HPLC-Säulen mit Innendurchmessern von größer 30 cm und Injektionsmengen von mehr als 200 g pro Chromatographielauf.

[0024] Damit ist das vorliegende Verfahren mit ursächlich dafür, daß z.B. oben genannte Oligopeptide in vorteilhafter und damit ökonomisch günstigerer Weise im Multikilogrammaßstab bereitzustellen sind.

[0025] Die Ausgangssubstanzen für die hier beschriebene Erfindung lassen sich nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden herstellen. Es sei auf die einschlägigen Lehrbücher verwiesen (Houben-Weyl, Methoden der

## EP 0 955 308 A1

organischen Chemie, Band 15/1 und 15/2; M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag 1984).

[0026] Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, sie jedoch keinesfalls einschränken:

### Beispiel 1:

5

Darstellung von Ac-D-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Pal-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub> x 2HCl (1a) (Cetrorelix-Hydrochlorid)

[0027] 50 g (31.65 mmol) Ac-D-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Pal-Ser('Bu)-Tyr('Bu)-D-Cit-Leu-Arg(HCl)-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub> werden unter starkem Rühren in 200 ml eisgekühlte konzentrierte Salzsäure gegeben. Man röhrt ca. 1 h bei 0-5°C, gibt die Reaktionsmischung auf ein gerührtes Gemisch aus 0.75 l n-Butanol und 0.5 kg Eis, trennt nach Zugabe von 120 ml Wasser die Phasen, stellt den pH-Wert der organischen Phase mit Natronlauge auf ca. 2 ein und dampft die butanolische Lösung i.Vak. ein. Der Rückstand wird in 0.5 l tert-Butylmethylether suspendiert, abgesaugt, mit 0.5 l tert-Butylmethylether gewaschen und i.Vak. getrocknet. Ausbeute an 1a : 49 g (103 %, Substanz enthält ca. 4 Gew.-% NaCl), HPLC-Reinheit 94.4 Fl.-%. (siehe Abb. 6)

15

### Beispiel 2:

20

Darstellung von Ac-D-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Pal-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub> x 2TFA (1b) (Cetrorelix-Trifluoracetat)

25

[0028] 1 g (0.633 mmol) Ac-D-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Pal-Ser('Bu)-Tyr('Bu)-D-Cit-Leu-Arg(HCl)-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub> werden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst, die Lösung 1.5 h gerührt und anschließend in 100 ml eiskalten Diisopropylether gegeben. Das Produkt 1b wird abgesaugt, mit Diisopropylether gewaschen und i.Vak. getrocknet. Ausbeute an 1b : 1.05 g (100 %), HPLC-Reinheit 89.6 Fl.-%. (siehe Abb. 7)

### Beispiel 3:

30

Darstellung von Ac-D-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Lys(ε-isopropyl)-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub> x 2HCl (2a) (Antarelix-Hydrochlorid)

35

[0029] 77.3 g (46.2 mmol) Ac-D-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Pal-Ser('Bu)-Tyr('Bu)-D-Hci-Leu-Lys(ε-Boc)(ε-isopropyl)-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub> werden unter starkem Rühren in 400 ml eisgekühlte, konzentrierte Salzsäure gegeben. Nach ca. 1 h gießt man die Reaktionsmischung auf ein Gemisch aus 0.85 l Wasser/0.85 kg Eis, extrahiert die wäßrige Lösung zweimal mit je 0.9 l n-Butanol, stellt den pH-Wert der vereinigten Butanolphasen mit gesättigter, wäßriger Natriumhydrogencarbonatlösung auf ca. 2 ein, trennt die Phasen und dampft die organische Phase i.Vak. ein. Der Rückstand wird mit 2 l tert-Butylmethylether digeriert, abgesaugt, mit tert-Butylmethylether gewaschen und i.Vak. getrocknet. Ausbeute 72 g (104 %, Substanz enthält ca. 2 Gew.-% NaCl und Reste Butanol), HPLC-Reinheit 94.0%. (siehe Abb. 8)

40

### Beispiel 4:

Darstellung von Ac-D-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Pal-Ser-Tyr-D-Hci-Leu-Lys(ε-isopropyl)-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub> x 2TFA (2b) (Antarelix-Trifluoracetat)

45

[0030] 1 g (0.6 mmol) Ac-D-Nal-D-p-Cl-Phe-D-Pal-Ser('Bu)-Tyr('Bu)-D-Hci-Leu-Lys(ε-Boc)(ε-isopropyl)-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub> werden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst, die Lösung ca. 1.5 h gerührt und anschließend in 100 ml eiskalten Diisopropylether gegeben. Das Produkt 1b wird abgesaugt, mit Diisopropylether gewaschen und i.Vak. getrocknet. Ausbeute an 1b : 1.01 g (100 %), HPLC-Reinheit 89.4 Fl.-%. (siehe Abb. 9)

50

### Beispiel 5:

Präparative Aufreinigung von Cetrorelix aus dem Rohprodukt der klassischen Synthese in Lösung (Beispiel 1):

55

[0031] 18 g des Rohproduktes aus einem Verfahren des Beispiels 1 werden in 500 ml 30%-iger Essigsäure gelöst und nach Filtration (über Seitz K-700-Filter) auf die Säule (Länge 250 mm, Innendurchmesser 100 mm) appliziert. Als stationäre Phase kann alternativ Nucleosil 300-7-C<sub>18</sub> der Fa. Macherey & Nagel oder Purospher RP 18 (10 mm) der Fa. Merck eingesetzt werden. Dabei wird die Säule zunächst 20 Minuten mit einem Lösungsmittelgemisch aus 95 % mobiler Phase A (970 ml Reinstwasser + 30 ml Acetonitril + 50 ml 100 %-iger Essigsäure) und 5 % mobiler Phase B

**EP 0 955 308 A1**

(700 ml Acetonitril + 300 ml Reinstwasser + 50 ml 100 %-iger Essigsäure) konditioniert. Anschließend erfolgt die Chromatographie auf der Nucleosil Phase nach folgendem Gradientenprogramm:

5

Zeit (min)	Konzentration A (Vol %)	Konzentration B (Vol %)
0	95	5
9	95	5
10	77	23
22	77	23
37	67	33
47	0	100
55	0	100

10

15

25

30

35

[0032] Der Eluentenfluß beträgt 200 ml/min, wobei sich je nach Gradientenbedingungen ein Säulendruck von 38-60 bar aufbaut.

Alternativ erfolgt die Chromatographie auf dem Purospher-Träger nach folgendem Gradientenprogramm :

Zeit (min)	Konzentration A (Vol %)	Konzentration B (Vol %)
0	95	5
20	95	5
21	70	30
60	65	35
61	0	100
70	0	100

[0034] Der Eluentenfluß beträgt in diesem Fall 300 ml/min, wobei sich je nach Gradientenbedingungen ein Säulendruck von 35-50 bar aufbaut.

[0035] Die Peakdetektion erfolgt im UV bei 270 nm, wobei eine manuelle Fraktionierung vorgenommen wird. Abgetrennt vom Hauptpeak (Reinheit > 99.5 %) werden ansteigende und abfallende Flanken (Reinheit ca. 95 %), die rezykliert werden. Aus den Fraktionen wird am Rotationsverdampfer bei ca. 50°C und Wasserstrahlvakuum Acetonitril bis auf ca. 1% entfernt. Anschliessend erfolgt die Lyophilisation der eingeengten Eluate.

**HPLC-Analytik des eingesetzten Rohproduktes:**

[0036] Dargestellt in Abbildung 1.

**Spezifikation des Rohproduktes:**

50

[0037]

Peptidreinheit : 94.4 % Fläche

55

Chloridgehalt : 6.2 %

Präparative HPLC des Cetorelix-Syntheserohproduktes auf der Nucleosil-Phase:

[0038] Dargestellt in Abbildung 2.

5 Präparative HPLC des Cetorelix-Syntheserohproduktes auf dem Purospher-Träger:

[0039] Dargestellt in Abbildung 3.

10 HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten Endproduktes:

[0040] Dargestellt in Abbildung 4.

Spezifikation des Endproduktes

15 [0041]

Peptidreinheit : 99.75 %

Chloridgehalt : 220 ppm

20 Acetatgehalt 6.5 %

Beispiel 6:

25 **Präparative Aufreinigung von Antarelix aus dem Rohprodukt der klassischen Synthese in Lösung**

[0042] 15 g des Rohproduktes werden in 500 ml 30%-iger Essigsäure gelöst und nach Filtration (über Seitz K-700-Filter) auf die Säule (Länge 250 mm, Innendurchmesser 100 mm) appliziert. Als stationäre Phase dient Purospher RP 18 (10 mm) der Fa. Merck. Dabei wird die Säule zunächst 20 Minuten mit einem Lösungsmittelgemisch aus 95 % mobiler Phase A (970 ml Reinstwasser + 30 ml Acetonitril + 50 ml 100 %-iger Essigsäure) und 5 % mobiler Phase B (700 ml Acetonitril + 300 ml Reinstwasser + 50 ml 100 %-iger Essigsäure) konditioniert. Anschließend erfolgt die Chromatographie nach folgendem Gradientenprogramm:

35

40

45

Zeit (min)	Konzentration A (Vol %)	Konzentration B (Vol %)
0	95	5
15	95	5
16	70	30
56	65	35
57	0	100
65	0	100

[0043] Der Eluentenfluß beträgt 300 ml/min, wobei sich je nach Gradientenbedingungen ein Säulendruck von 35-50 bar aufbaut. Die Peakdetektion erfolgt im UV bei 270 nm, wobei eine manuelle Fraktionierung vorgenommen wird. 50 Abgetrennt vom Hauptpeak (Reinheit > 99.5 %) werden ansteigende und abfallende Flanken (Reinheit ca. 95 %), die rezykliert werden. Aus den Fraktionen wird am Rotationsverdampfer bei ca. 50°C und Wasserstrahlvakuum Acetonitril bis auf ca. 1% entfernt. Anschließend erfolgt die Lyophilisation der eingegangten Eluate.

55 Präparative HPLC des Antarelix-Syntheserohproduktes auf dem Purospher-Träger:

[0044] Dargestellt in Abbildung 5.

## EP 0 955 308 A1

### Spezifikation des Endproduktes

#### [0045]

5 Peptidreinheit : 99.39 %  
Chloridgehalt : <200 ppm  
Acetatgehalt 10 7.5 %

#### 10 Beispiel 7:

#### **Präparative Aufreinigung von Cetrorelix Im System Methanol/Wasser/Essigsäure**

15 [0046] 4 g des Rohproduktes werden in 60 ml 30%-iger Essigsäure gelöst und nach Filtration (über Seitz K-700-Filter) auf die Säule (Länge 250 mm, Innendurchmesser 40 mm) appliziert. Als stationäre Phase dient Deltapak 300 Å, 15 mm der Fa. Millipore. Dabei wird die Säule zunächst 20 Minuten mit mobiler Phase A (950 ml Reinstwasser + 50 ml Methanol + 60 ml 100 %-iger Essigsäure) konditioniert.  
[0047] Anschließend erfolgt die Chromatographie nach folgendem Gradientenprogramm (mobile Phase B: 950 ml 20 Methanol + 50 ml Reinstwasser + 60 ml 100 %-iger Essigsäure):

Zeit (min)	Konzentration A (Vol %)	Konzentration B (Vol %)
0	100	0
10	100	0
11	70	30
30 40	30	70
41	0	100
50	0	100

35 [0048] Der Eluentenfluß beträgt 60 ml/min, wobei sich je nach Gradientenbedingungen ein Säulendruck von 20-30 bar aufbaut. Die Peakdetektion erfolgt im UV bei 270 nm, wobei eine manuelle Fraktionierung vorgenommen wird. Abgetrennt vom Hauptpeak (Reinheit > 99.5 %) werden ansteigende und abfallende Flanken (Reinheit ca. 95 %), die rezykliert werden. Aus den Fraktionen wird am Rotationsverdampfer bei ca. 50°C und Wasserstrahlvakuum Methanol 40 bis auf ca. 1% entfernt. Anschließend erfolgt die Lyophilisation der eingeengten Eluate.

### Spezifikation des Endproduktes

#### [0049]

45 Peptidreinheit : 99.60 %  
Chloridgehalt : 220 ppm  
Acetatgehalt 50 7.1 %

### **Patentansprüche**

55 1. Verfahren zur einstufigen Umsalzung und Aufreinigung von Oligopeptiden durch Flüssigchromatographie mit ace-tathaltigen Laufmitteln zum Erhalt des Oligopeptidacetats,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man die Oligopeptide als deren Hydrochloridsalze zur Reinigung einsetzt.

EP 0 955 308 A1

2. Verfahren nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man die geschützten Vorstufen der Oligopeptide mit konzentrierter Salzsäure entschützt.

5 3. Verfahren nach Anspruch 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man das pure Chloridsalz des Oligopeptids durch Lyophilisation dessen salzsaurer Lösung erhält.

10 4. Verfahren nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man das Chloridsalz des Oligopeptids als seine konzentrierte salzaure wäßrige Lösung einsetzt.

15 5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man das pure Chloridsalz nach Lösen in dem Laufmittel der Flüssigkeitschromatographie oder nach Lösen in Essigsäure einsetzt.

20 6. Verfahren nach Anspruch 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man bei einer Temperatur von -25 bis 30°C arbeitet.

25 7. Verfahren nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man als Flüssigchromatographie die Hochdruckflüssigkeitschromatographie anwendet.

8. Verfahren nach Anspruch 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man mit einem Lösungsmittelsystem der folgenden Zusammensetzung arbeitet:

30

35

Laufmittel A	Laufmittel B
i. 85 bis 98% Wasser	i. 20 bis 48% Wasser
ii. 2 bis 10% Essigsäure	ii. 2 bis 10% Essigsäure
iii. 0 bis 5% Acetonitril	iii. 50 bis 70% Acetonitril

oder

40

45

Laufmittel A	Laufmittel B
i. 85 bis 98% Wasser	i. 0 bis 10% Wasser
ii. 2 bis 10% Essigsäure	ii. 2 bis 10% Essigsäure
iii. 0 bis 5% Methanol	iii. 80 bis 98% Methanol,

50

9. Verfahren nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man mit folgendem Lösungsmittelsystem arbeitet:

55

Laufmittel A	Laufmittel B
i. 92% Wasser	i. 28% Wasser

**EP 0 955 308 A1**

(fortgesetzt)

Laufmittel A	Laufmittel B
ii. 5% Essigsäure	ii. 5% Essigsäure
iii. 3% Acetonitril	iii. 67% Acetonitril

5

oder

10

Laufmittel A	Laufmittel B
i. 90% Wasser	i. 5% Wasser
ii. 5% Essigsäure	ii. 5% Essigsäure
iii. 5% Acetonitril	iii. 90% Acetonitril

15

10. Verfahren nach Anspruch 8 und 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man bei einer Temperatur von 5 bis 50°C arbeitet.
11. Verfahren nach Anspruch 8 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man mit einem Druck von 5 bis 100 bar arbeitet.
12. Verfahren nach Anspruch 8 bis 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man als stationäre Phase Reversed-Phase-Säulenmaterial verwendet.
13. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man als Oligopeptid ein Peptid aus mindestens fünf und höchstens fünfundzwanzig Aminosäuren einsetzt.
14. Verfahren nach Anspruch 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man ein Peptid aus acht bis sechszehn Aminosäuren einsetzt.
15. Verfahren nach Anspruch 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man ein Peptid aus zehn Aminosäuren einsetzt.
16. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man die Flüssigchromatographie nach der Simulated-Moving-Bed Methode oder mittels cyclischer Chromatographie durchführt.

50

55

Abb. 1

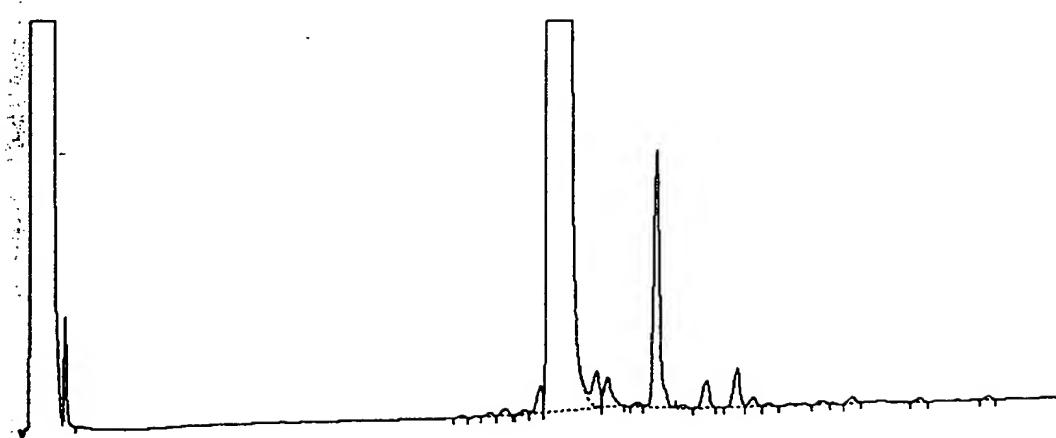


Abb. 2

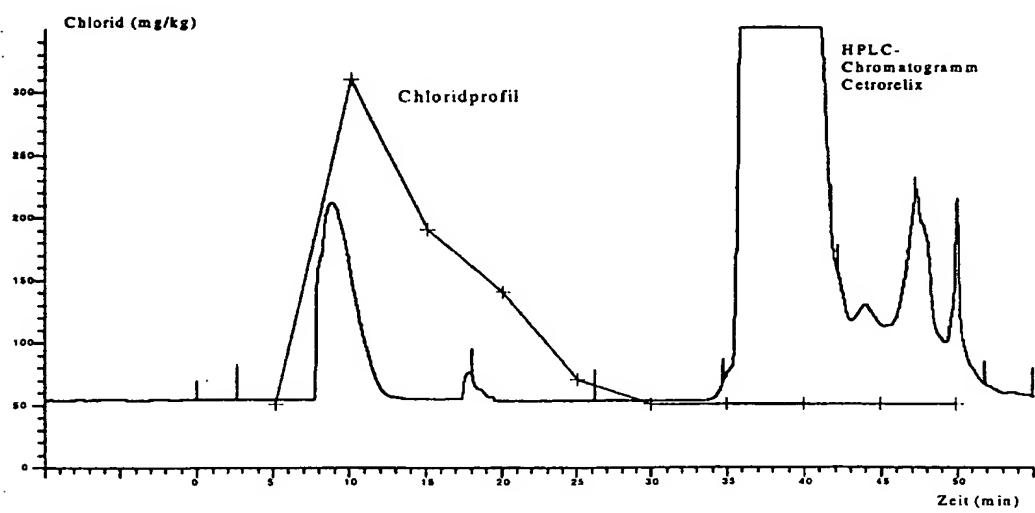


Abb. 3

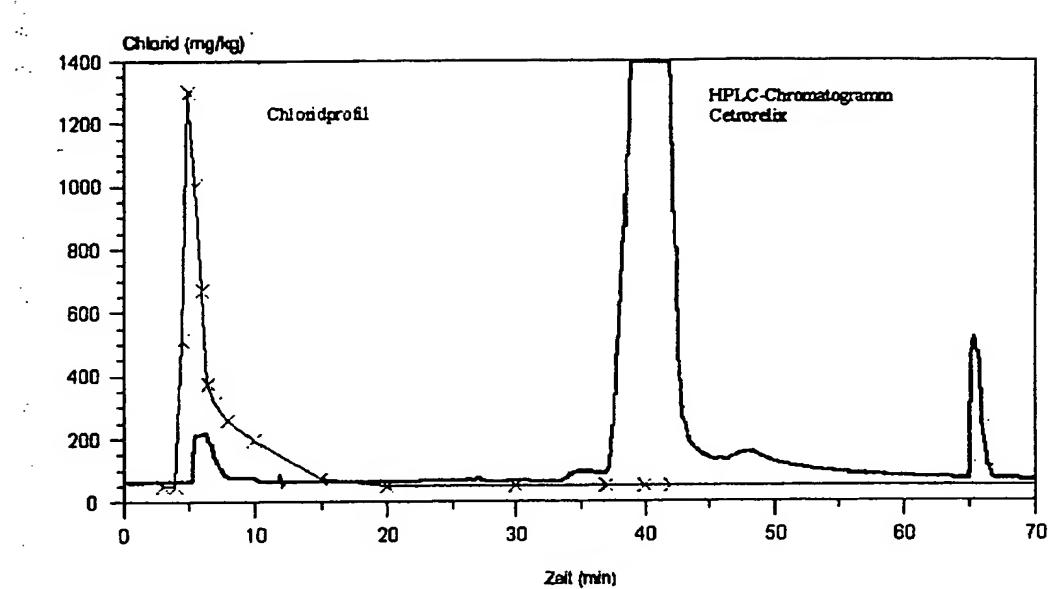


Abb. 4

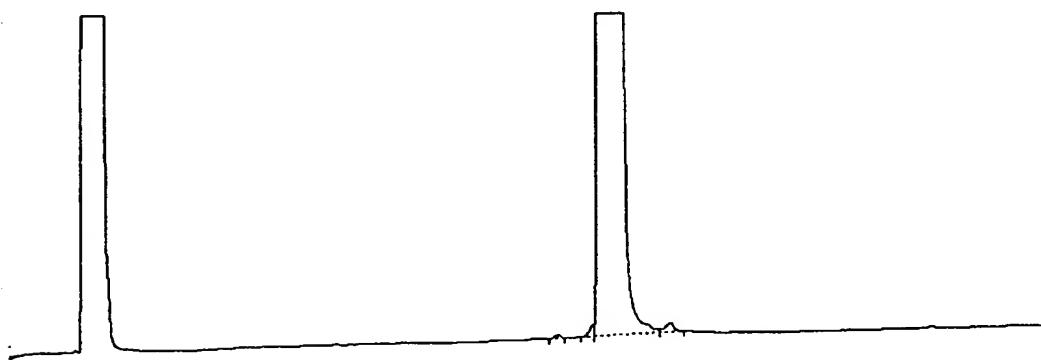


Abb. 5

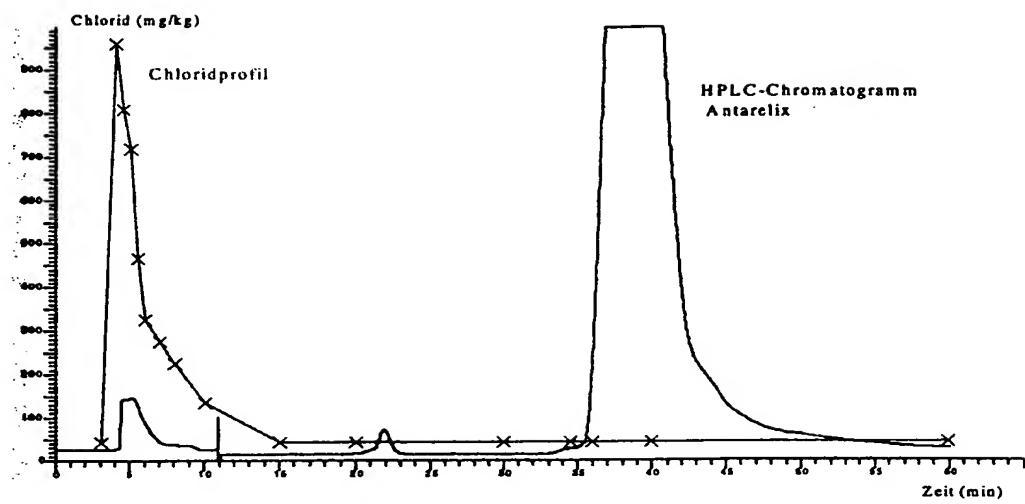
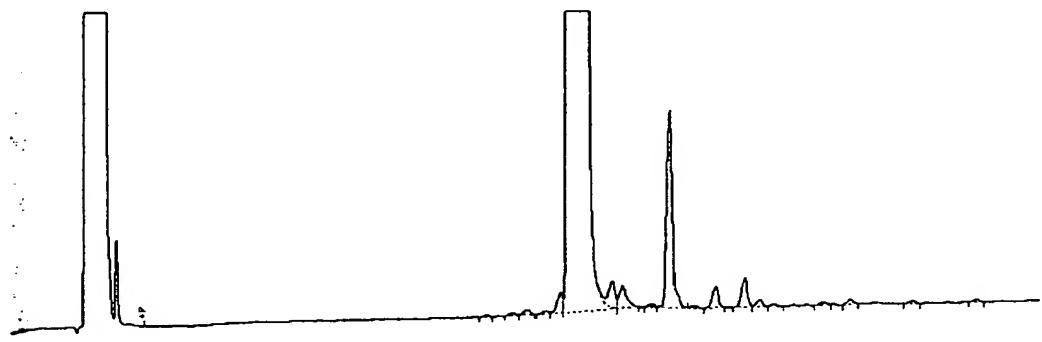
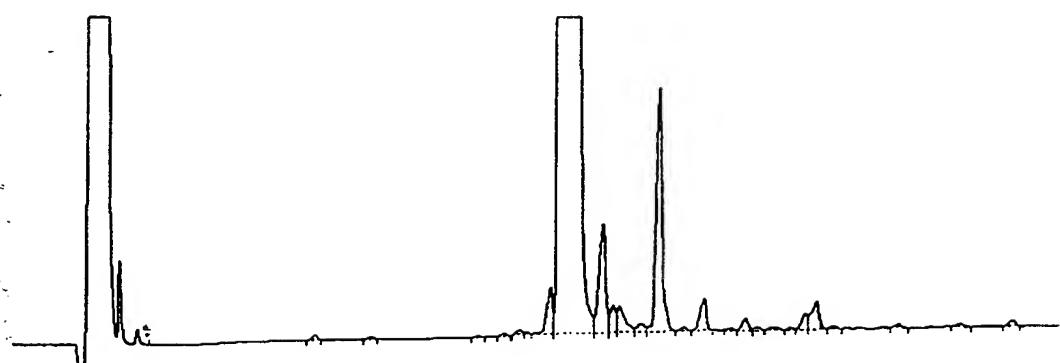


Abb. 6

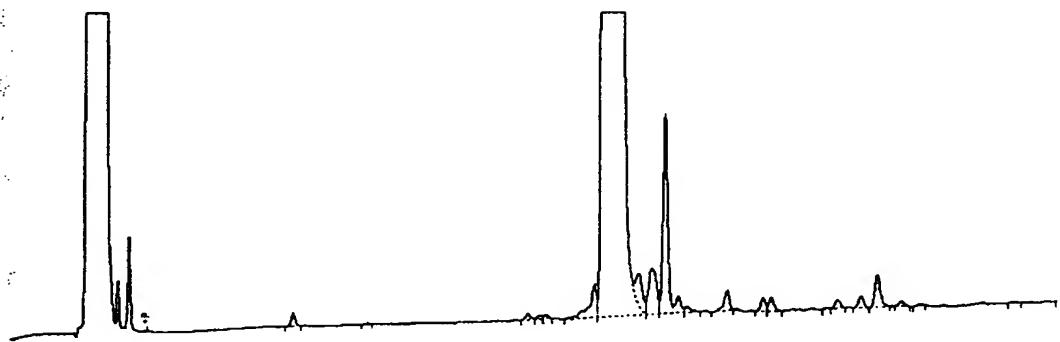


**EP 0 955 308 A1**

**Abb. 7**

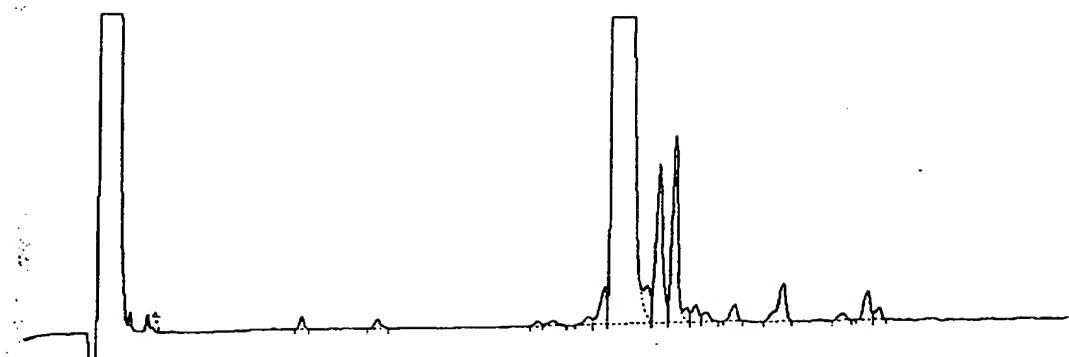


**Abb. 8**



**EP 0 955 308 A1**

**Abb. 9**





Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 99 10 5639

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	GB 2 152 059 A (KOZPONTI VALTO-ES HITELBANK RT INNVOACIOS ALAP) 31. Juli 1985 (1985-07-31) * das ganze Dokument * ---	1	C07K1/12 C07K1/36 C07K7/23
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 23, 4. Juni 1990 (1990-06-04) Columbus, Ohio, US; abstract no. 217553, J MICHALSKY ET AL.: "Preparation of alpha-aspartylphenylalanine methyl and ethyl esters" XP002109980 & CS 261 262 A (MICHALSKY ET AL.) * Zusammenfassung *	1	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 11, 15. März 1993 (1993-03-15) Columbus, Ohio, US; abstract no. 102429, H NAHARISSOA ET AL.: "Use of 6M hydrochloric acid for removal of the N-alpha-tert-butyloxycarbonyl group during solid-phase peptide synthesis" XP002109981 & PEPT RES, Bd. 5, Nr. 5, 1992, Seiten 293-299, * Zusammenfassung * ---	1	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.6) C07K.
		-/-	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abarbeitungsdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	22. Juli 1999	Masturzo, P	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 99 10 5639

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 25, 18. Dezember 1989 (1989-12-18) Columbus, Ohio, US; abstract no. 233550, Y KAWASAKI ET AL.: "Development for the simple synthetic method of oligopeptides" XP002109982 &amp; CHEM. EXPRESS, Bd. 3, Nr. 11, 1988, Seiten 703-706, * Zusammenfassung *</p> <p>-----</p>	1	
RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.6)			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	22. Juli 1999	Masturzo, P	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldeatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 10 5639

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

22-07-1999

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
GB 2152059 A	31-07-1985	AT 394727 B AT 404284 A AU 583803 B AU 3709884 A BE 901307 A CA 1268897 A CH 664968 A CZ 8410210 A DD 255164 A DE 3446997 A DK 625084 A, B, FI 845051 A, B, FR 2557114 A GR 82556 A JP 60226898 A LU 85710 A NL 8403888 A SE 469032 B SE 8406554 A SU 1396970 A US 4647553 A		10-06-1992 15-11-1991 11-05-1989 04-07-1985 19-06-1985 08-05-1990 15-04-1988 16-02-1994 23-03-1988 11-07-1985 24-06-1985 24-06-1985 28-06-1985 23-04-1985 12-11-1985 17-07-1986 16-07-1985 03-05-1993 24-06-1985 15-05-1988 03-03-1987
CS 261262 A	15-06-1988	CS 8703862 A	15-06-1988	